

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 13 377.0

**Anmeldetag:** 17. März 2000

**Anmelder/Inhaber:** Dade Behring Marburg GmbH, Marburg/DE

**Bezeichnung:** Induzierte Aggregation und Agglutination von Plättchen

**IPC:** G 01 N 33/49

**Bemerkung:** Die nachgereichte Zeichnung mit der Figur 1 e ist am 28. Juli 2000 eingegangen.

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 13. September 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

## 5 Induzierte Aggregation und Agglutination von Plättchen

---

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung der Aggregation oder Agglutination von Plättchen, wobei ein Reaktionsgemisch in einer ersten Reaktionsphase durchmischt wird und in einer auf die erste folgenden, zweiten Reaktionsphase weniger intensiv oder gar nicht durchmischt wird und die Messung bevorzugterweise in der zweiten Reaktionsphase erfolgt.

Blut besteht im wesentlichen aus dem Blutplasma, einer Lösung von niedermolekularen Substanzen und Proteinen, und zellulären Bestandteilen, von denen die Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen) den größten Anteil ausmachen.

Thrombozyten haben in vivo hauptsächlich die Funktion, auf eine Verletzung schnell zu reagieren und die ersten Schritte zum Wundverschluß einzuleiten. Sie werden durch verschiedene Faktoren aktiviert und im Zuge der Aktivierung werden sie "klebrig", wie man es früher treffend nannte. Sie adherieren dann sowohl an verletzte Oberflächen als auch aneinander. Die Adhäsion aneinander nennt man Aggregation, wenn sie aktiv stattfindet, und Agglutination, wenn sie passiv, das heißt ohne physiologische Aktivität, abläuft.

Im Folgenden ist bei Benutzung des Terminus "Aggregation" sowohl die Aggregation als auch die Agglutination von Plättchen gemeint.

Die Fähigkeit zur Aggregation ist also wichtig für den Wundverschluß. Sie kann durch eine Vielzahl von Faktoren verstärkt oder verringert sein. Dazu gehören z.B. Krankheiten, Operationen, Medikamenteneinnahmen und die Zahl der Thrombo-

zyten. Eine Verstärkung der Aggregationsneigung kann zu Thrombosen und eine Verringerung der Aggregationsneigung kann zu Blutungen führen.

Zur Untersuchung der Aggregationseigenschaften von Plättchen wurde von O'Brian (J. Clin. Path., 1962, 15, 452-455) und von Born (J. Physiol., 1963, 168, 178-195) eine Methode zur Plättchenaggregationsmessung entwickelt, die sich in den folgenden Jahrzehnten in der klinischen Diagnostik durchgesetzt hat (Bick RL, Clinics in Laboratory Medicine, Thrombosis and Hemostasis for the clinical laboratory: Part II, Volume 15, 1, 1-38). Bei der Methode wird zuerst Plättchen-reiches Plasma hergestellt. Im Ansatz wird zumeist ein Aktivator dazugegeben und unter permanentem Rühren die Extinktion verfolgt. Die Bildung der Aggregate kann durch die Abnahme der Extinktion quantitativ verfolgt werden. Zur Messung werden Spezialgeräte, sogenannte Aggregometer, verwendet, da übliche Photometer nicht über einen kontrollierten Rührmechanismus und angepaßte Auswertemodi verfügen.

Der Vorteil der Methode besteht in der quantitativen und kinetischen Messung der Aggregation und in der relativ leichten Automatisierbarkeit. Von Nachteil ist es, daß spezialisierte Geräte mit einem Rührmechanismus während der Messung benötigt werden. Diese Geräte, die Aggregometer, sind teuer und die Anschaffung lohnt sich nicht für jedes Labor. Da die Anzahl der Messungen oft limitiert ist, haben sich auch keine vollautomatisierten Geräte durchgesetzt und die Abarbeitung ist entsprechend umständlich. Auf der anderen Seite existieren eine Vielzahl von Analyseautomaten mit sehr hohem Automatisierungsgrad, die auf Grund der photometrischen Meßeinheit prinzipiell die Extinktionsabnahme messen könnten, aber nicht über die notwendige permanente Rührmöglichkeit verfügen.

Für die Messung der Plättchenaggregation ist nach derzeitigem Stand der Technik ein permanentes Rühren notwendig. Wie bereits die Arbeit von Born (1963) zeigte, ist die Aggregationsgeschwindigkeit stark von der Rührgeschwindigkeit abhängig. Aktuellere, methodische Übersichtsartikel setzten die Notwendigkeit des Rührens als selbstverständlich voraus (Yardumian DA, J Clin Pathol, 39, 1986, 701 – 712.

Bick RL, Thrombosis and Hemostasis for the Clinical Laboratory: Part II, 15, 1995, 272 – 2712).

Das Rühren bewirkt vermutlich durch eine Erhöhung der Kollisionsfrequenz die Bildung größerer Aggregate, sogenannter Makroaggregate. Mikroaggregate, bestehend aus 2-3 Plättchen, entstehen auch ohne Rühren (Longmire K. and Frojmovic M., Biophys J, 1990, 58(2):299-307). Diese Mikroaggregate sind aber in herkömmlichen Aggregometern nicht sichtbar (Toghi et al., Thromb Haemost, 1996, 75(5):38-43).

10

Auch die Bildung der Makroaggregate im von Willebrand Ristocetin-Kofaktor-Test läuft sehr ähnlich ab, wie bei der Aggregation von Plättchen in frischem Plättchenreichem Plasma. Bei dem Ristocetin-Kofaktor-Test werden fixierte Thrombozyten durch die Zugabe von Plasma, das das von Willebrand-Protein enthält, und Ristocetin zur Agglutination gebracht (Weiss HJ et al., J Clin Invest, 1973, 52, 2708-2716.). Auch im Ristocetin-Kofaktor-Test zeigt die turbidimetrische Messung unter Rühren hauptsächlich die Bildung der Makroaggregate an (Kitek A. und Breddin K., 1980, Thromb & Haemost, 44, 1980, 3, 154-158. Toghi et al., Thromb Haemost, 1996, 75(5):38-43).

20

Der vorliegenden Erfindung lag also die Aufgabe zugrunde, ein Messverfahren zu finden, mittels dessen eine Plättchenaggregation auch ohne permanentes Rühren gemessen werden kann.

25

Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Bildung von Makroaggregaten nicht unbedingt des permanenten Rührens bedarf, sondern daß ein kurze Rührzeit nach Zugabe des Aktivators ausreicht, um eine Bildung von Makroaggregaten zu induzieren. Die Bildung der Makroaggregate erfolgt nach der Induktionsphase allein unter Einwirkung der Brownschen Diffusion.

30

Die Induktion der Makroaggregatbildung ist bei Benutzung verschiedener Aktivatoren möglich (Abb. 1). Die Reaktionskinetik der Bildung der Makroaggregate durch

Brownsche Diffusion ist bei den verschiedenen Aktivatoren sehr unterschiedlich. Für die Bildung der Makroaggregate ist einerseits die Frequenz von Kollisionen von Mikroaggregaten mit anderen Mikroaggregaten oder einzelnen Plättchen entscheidend. Andererseits ist es wichtig, daß eine Kollision "erfolgreich" ist, wobei wiederum der Aktivierungszustand, die Ladungsverhältnisse, die Größe und Zahl der Pseudopodien und viele weitere Parameter eine Rolle spielen. Da die Agonisten einen sehr unterschiedlichen Ablauf der Aktivierung bewirken, ist es verständlich, daß gerade die Makroaggregatbildung nach Stop des Rührers bei den verschiedenen Agonisten sehr unterschiedlich ausfallen. Der Aktivierungszustand in dem Augenblick, in dem das Rühren gestoppt wird, ist sicherlich ein wichtiger Parameter für die Stärke der daraufhin ablaufenden Reaktion.

Die klassische Aggregationsmessung (Dauerrühren) und die induzierten Aggregationsmessung (Rühren nur zu Beginn) eignen sich gleichermaßen, um die Aktivität von Thrombozyten zu erfassen. Beispielhaft wurde dazu sowohl die Konzentrationsabhängigkeit vom Agonisten als auch die Alterung von Plättchen-reichem Plasma untersucht. Die Aggregationsgeschwindigkeit ohne Dauerrühren liegt auf einem niedrigerem Niveau. Sie reagiert aber auf eine Konzentrationsänderung des Agonisten ADP und auf eine Alterung von Plättchen-reichem Plasma (bei Raumtemperatur) auf sehr ähnliche Weise (Abb. 7).

Überraschenderweise wurde auch gefunden, daß das Rühren nicht nur die Bildung von Makroaggregaten ermöglicht, sondern auch für die gegenteilige Reaktion, die Zerstörung von Makroaggregaten, verantwortlich sein kann. Das scheinbare Ende einer Aggregationsreaktion, typischerweise nach 5-10 Minuten, kann in Wirklichkeit ein Gleichgewichtszustand zwischen Bildung und Zerstörung von Makroaggregaten sein. Dies wird deutlich, wenn man in einem typischen vWF:RCo (von Willebrand Ristocetin-Kofaktor)-Test nach Abschluß eines Großteils der Reaktion das Rühren aussetzt. Kurze Zeit später setzt ein starker Extinktionsabfall ein, was auf die Bildung von besonders großen Makroaggregaten, die im folgenden Superaggregate genannt werden sollen, hindeutet (Abb. 2). Der Extinktionsabfall ist in etwa gleich groß wie bei einem sehr schwachen Rühren mit 50 UPM, wodurch klar wird, daß nicht etwa

die Sedimentation von Aggregaten den Extinktionsabfall bewirkt. Da beim vWF:RCo-Faktor-Test die Thrombozyten Formalin-fixiert sind, ist auch ausgeschlossen, daß eine mit Verzögerung einsetzende biochemische Reaktion die Aggregatbildung bewirkt.

5

Unter Rühren im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind auch die anderen, dem Fachmann bekannten Methoden der Durchmischung von Flüssigkeiten zu verstehen, wie zum Beispiel die Durchmischung durch Rühren, Schütteln, Ultraschall oder Vibration. Die Durchmischung kann auch durch die Bewegung in einem Zentrifugalanalysator oder durch Umpumpen des Reaktionsgemisches durch einen Pipettor oder die forcierte Zugabe der Reagenzien in das Reaktionsgefäß erfolgen.

10

Der Bildung der Superaggregate wird bereits nach einer relativ kurzen Zeit (z.B. 30 Sekunden) induziert (Abb. 3).

15

Die Superaggregatbildung, ermöglicht durch reine Diffusion, ist wie die Aggregatbildung, die durch das Rühren herbeigeführt wird, in Geschwindigkeit und Endpunkt abhängig von der Von Willebrand-Konzentration (Abb. 4, Standard Human Plasma Verdünnungen). Dadurch kann eine Aggregationsmessung methodisch auch so durchgeführt werden, daß das Reaktionsgemisch kurze Zeit gerührt (oder auf andere Weise durchmischt) wird und dann erst die Messung der Extinktion erfolgt. Bereits sehr kurze Rührzeiten von wenigen Sekunden können eine Superaggregatbildung induzieren (Abb. 5). Auch bei diesen kurzen Zeiten ist eine Konzentrationsabhängigkeit im Ristocetin-Kofaktor-Test gegeben und die Präzision der Messungen ist mit denen bei langen Rührzeiten vergleichbar (Abb. 6).

20

25

Damit ergibt sich die Möglichkeit, den Ristocetin-Kofaktor-Test und die Plättchenaggregation auf allen Analyseautomaten zu adaptieren, bei denen eine genügende und reproduzierbare Durchmischung des Ansatzes erfolgen kann und danach eine Messung der Aggregatbildung, zum Beispiel durch Turbidimetrie, durchgeführt werden kann. Die Auswertung kann sowohl kinetisch oder über andere (z.B. Start und/oder Endpunkt-) Methoden oder auch kombinierte Methoden erfolgen.

30

Man kann auch die Stabilität von Plättchenaggregaten durch den Vergleich der Aggregation in dem erfindungsgemäßen Verfahren mit einer analogen Messung bei ständigem Rühren feststellen. Bei instabilen Aggregaten ist die Bildung von Aggre-

5     gaten ohne dauerhaftes Rühren relativ stark im Verhältnis zur Bildung von Aggre-

10    gaten bei Dauerrühren. Ebenso kann das Verhältnis der Bildung von Aggregaten ganz ohne Rühren im Verhältnis zu kurzzeitigem oder dauerhaften Rühren von Bedeutung sein. Dadurch können wichtige zusätzliche diagnostische Informationen darüber gewonnen werden, wie wichtig unter verschiedenen physiologischen Bedin-

15    gungen das Ausmaß von Strömungen auf die Aktivierung und Aggregatbildung sowie auf die Aggregatstabilität von Thrombozyten ist. Im Ristocetin-Kofaktor-Test kann dadurch die Fähigkeit des von Willebrand Faktors oder anderer Plasmakomponenten, stabile Aggregate zu bilden untersucht werden.

15    Darüberhinaus kann durch sich abwechselnde Phasen von Rühren und Nicht-Rühren die Entstehung und die Auflösung von Aggregaten gemessen werden. Damit können wichtige Informationen über die Dynamik solcher Reaktionen gesammelt werden.

20    Die Dauer der aktiven Durchmischung hängt wesentlich von der Art des Assays ab, sie sollte zum Beispiel bei der Bestimmung der Plättchenaggregation 10-60 Sekunden betragen, beim Ristocetin-Kofaktor-Test 5-60 Sekunden, allgemein kann man sagen, sie nicht länger als 50 %, bevorzugterweise zwischen 1 und 40 %, ganz besonders bevorzugterweise zwischen 2 und 25 % der gesamten Messzeit dauern

25    kann.

Die Aggregatbildung beim Ristocetin-Kofaktor-Test findet mit physiologisch inaktiven Plättchen statt. Somit können auch andere Partikel, an deren Oberfläche Rezeptormoleküle die Aggregatbildung mit Plättchen oder mit anderen Partikeln direkt oder

30    indirekt über Liganden vermitteln, im erfindungsgemäßen Verfahren zu Anwendung kommen.

Die folgenden Beispiele sollen lediglich die Erfindung erläutern, sie aber in keiner Weise einschränken.



### **Beispiel 1)**

#### **Bestimmung der Plättchenaggregation mit Ristocetin als Agonisten**

- 5    135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l Ristocetin-Lösung (15 mg/ml) gemischt und 20 bzw. 40 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt (Schreiner, W. et al. Comput. Biol. Med., Vol. 21, No. 6, 435-441, 1991).

10

### **Beispiel 2)**

#### **Bestimmung der Plättchenaggregation mit Kollagen als Agonisten**

15

- 135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l Kollagen-Lösung (2000  $\mu$ g/ml) gemischt und 20 bzw. 40 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

20

### **Beispiel 3)**

#### **Bestimmung der Plättchenaggregation mit Epinephrine als Agonisten**

25

- 135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l Epinephrine-Lösung (100  $\mu$ M) gemischt und 20 bzw. 40 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

30

#### **Beispiel 4)**

##### **Bestimmung der Plättchenaggregation mit ADP als Agonisten**

- 5    135  $\mu$ l Plättchen-reiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l ADP-Lösung (200  $\mu$ M) gemischt und 20 bzw. 40 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

10

#### **Beispiel 5)**

##### **Bestimmung der Plättchenaggregation mit Arachidonsäure als Agonisten**

- 15    135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l Arachidonsäure-Lösung (5000  $\mu$ g/ml) gemischt und 20 bzw. 40 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

20

#### **Beispiel 6)**

##### **Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 200 Sekunden Rührzeit (Abb. 2)**

25

- 20  $\mu$ l Plasma wurden mit 20  $\mu$ l Imidazol-Puffer und 150  $\mu$ l von Willebrand Reagenz (Dade Behring, Marburg, ca. 1.2 Mio formalin-fixierte Thrombozyten/ $\mu$ l, 1.2 mg/ml Ristocetin) gemischt und 200 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.
- 30

### **Beispiel 7)**

#### **Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 30 Sekunden Rührzeit (Abb. 3)**

5

20 µl Plasma wurden mit 20 µl Imidazol-Puffer und 150 µl von Willebrand Reagenz (Dade Behring, Marburg, ca. 1.2 Mio formalin-fixierte Thrombozyten/µl, 1.2 mg/ml Ristocetin) gemischt und 30 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

10

### **Beispiel 8)**

#### **Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität von Standardhumanplasma-Verdünnungen nach 30 Sekunden Rührzeit (Abb. 4)**

15

20 µl Plasma wurden mit Imidazol-Puffer in verschiedenen Stufen verdünnt (100% = unverdünnt), mit weiteren 20 µl Imidazol-Puffer und 150 µl von Willebrand Reagenz (Dade Behring, Marburg, ca. 1.2 Mio formalin-fixierte Thrombozyten/µl, 1.2 mg/ml Ristocetin) gemischt und 30 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

20

25

### **Beispiel 9)**

#### **Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 5-60 Sekunden Rührzeit (Abb. 5)**

30

40 µl Plasma wurden mit 100 µl von Willebrand Reagenz (Dade Behring, Marburg, ca. 2.4 Mio formalin-fixierte Thrombozyten/µl, 2.4 mg/ml Ristocetin) gemischt und 5,

10, 20, 45 oder 60 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

5

### **Beispiel 10)**

#### **Ermittlung von Kalibrationskurven mit Standard-Human-Plasma-Verdünnungen nach 5-60 Sekunden Rührzeit (Abb. 6)**

10

40  $\mu$ l Standard-Human-Plasma (ca. 100% vWF) wurde mit Imidazol-Puffer verdünnt (Stufen 50, 25, 10, 5, 1 %) und mit 100  $\mu$ l von Willebrand Reagenz (Dade Behring, Marburg, ca. 2.4 Mio formalin-fixierte Thrombozyten/ $\mu$ l, 2.4 mg/ml Ristocetin) gemischt und 5, 10, 20, 45 oder 60 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte nach dem Stop des Rührers. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) nach dem Stop des Rührers bestimmt.

15

20

### **Beispiel 11)**

#### **Bestimmung der ADP-Konzentrationsabhängigkeit der Plättchenaggregation mit und ohne Dauerrühren (Abb. 7, linkes Diagramm)**

25

135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l ADP-Lösung (10 bzw. 25  $\mu$ M) gemischt und dauerhaft bzw. 20 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte direkt nach dem Mischen (Dauerrühren) bzw. nach dem Stop des Rührers bei 20 Sekunden. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) bestimmt.

30

### Beispiel 12)

**Bestimmung des Verlusts an Aktivität durch Lagerung von Plättchen-reichem Plasma bei Raumtemperatur durch Messung der Aggregation mit ADP als Agonist mit und ohne Dauerrühren (Abb. 7, rechtes Diagramm)**

135  $\mu$ l Plättchenreiches Plasma wurden mit 15  $\mu$ l ADP-Lösung (200  $\mu$ M) gemischt und dauerhaft bzw. 20 Sekunden bei 600 UPM gerührt. Die Auswertung erfolgte direkt nach dem Mischen (Dauerrühren) bzw. nach dem Stop des Rührers bei 20 Sekunden. Zur Auswertung wurde die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$  der Extinktionsabnahme) bestimmt.

**Abbildungen:**

**Fig. 1a-e)**

Bestimmung der induzierten Plättchenaggregation mit unterschiedlichen Agonisten

5

**Fig. 2)**

Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 200 Sekunden  
Rührzeit

10 **Fig. 3)**

Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 30 Sekunden  
Rührzeit

**Fig. 4)**

15 Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität von Standardhuman-  
plasma-Verdünnungen nach 30 Sekunden Rührzeit

**Fig. 5)**

Bestimmung der von Willebrand-Ristocetin-Kofaktoraktivität nach 5-60 Sekunden  
20 Rührzeit

**Fig. 6)**

Ermittlung von Kalibrationskurven mit Standard-Human-Plasma-Verdünnungen nach  
5-60 Sekunden Rührzeit

25

**Fig. 7a)**

Bestimmung der ADP-Konzentrationsabhängigkeit der Plättchenaggregation mit und  
ohne Dauerrühren

30

**Fig. 7b)**

Bestimmung des Verlusts an Aktivität durch Lagerung von Plättchen-reichem Plasma bei Raumtemperatur durch Messung der Aggregation mit ADP als Agonist mit und ohne Dauerrühren

**Patentansprüche:**

- 5 1) Verfahren zur Messung der Aggregation oder Agglutination von Plättchen, wobei ein Reaktionsgemisch in einer ersten Reaktionsphase durchmischt wird und in einer auf die erste folgenden, zweiten Reaktionsphase weniger intensiv oder gar nicht durchmischt wird, wobei die Messung bevorzugterweise in der zweiten Reaktionsphase erfolgt.
- 10 2) Verfahren nach Anspruch 1) wobei die Durchmischung durch Rühren, Schütteln, Vibrieren oder Ultraschall erfolgt.
- 15 3) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23, zur Bestimmung der Aggregation von physiologisch aktiven Plättchen
- 4) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 2, zur Bestimmung der Agglutination von fixierten Plättchen im Ristocetin-Kofaktor Test.
- 20 5) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Probe Vollblut, Plättchen-reiches Plasma, verdünntes Plättchen-reiches Plasma, oder gereinigte Thrombozyten für die Messung eingesetzt werden.
- 25 6) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei turbidimetrische oder nephelometrische Methoden zur Messung der Aggregatbildung eingesetzt werden.
- 30 7) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei elektromagnetische Methoden zur Messung der Aggregatbildung eingesetzt werden.



- 8) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, zur Bestimmung der Sensitivität von Plättchen gegenüber auslösenden Faktoren, wobei die Durchmischungszeit, die notwendig ist, um die Aggregationsreaktion auszulösen, bestimmt wird.

5

- 9) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, zur Bestimmung der Stabilität von Plättchenaggregaten, durch Vergleich der Aggregation in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 und einer analogen Messung bei ständigem Rühren.

10

- 10) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei vor der Durchmischungsphase eine Inkubationsphase ohne Durchmischung eingefügt ist.

15

- 11) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei vor der Durchmischungsphase ein Ausgangswert bestimmt wird.

- 12) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Ausmaß der Aggregation bestimmt wird durch die Zählung der übriggebliebenen nicht aggregierten Plättchen

20

- 13) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Aggregation von Plättchen und Partikeln gemessen wird.

25

- 14) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei anstelle von Plättchen andere Zellen oder künstliche Partikel verwendet werden.

- 15) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Durchmischung nicht komplett gestoppt wird sondern auf eine geringere Intensität eingestellt wird.

30

- 16) Verwendung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei mehrere durchmischte und nicht-durchmischte Phasen aufeinander folgen.

Dade Behring Marburg GmbH

2000/B001 - Ma 1224  
Dr. Pfe/Zi

## **Zusammenfassung**

5

### **Induzierte Aggregation und Agglutination von Plättchen**

---

- 10 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung der Aggregation oder Agglutination von Plättchen, wobei ein Reaktionsgemisch in einer ersten Reaktionsphase durchmischt wird und in einer auf die erste folgenden, zweiten Reaktionsphase weniger intensiv oder gar nicht durchmischt wird und die Messung bevorzugterweise in der zweiten Reaktionsphase erfolgt.

Fig. 1 a)

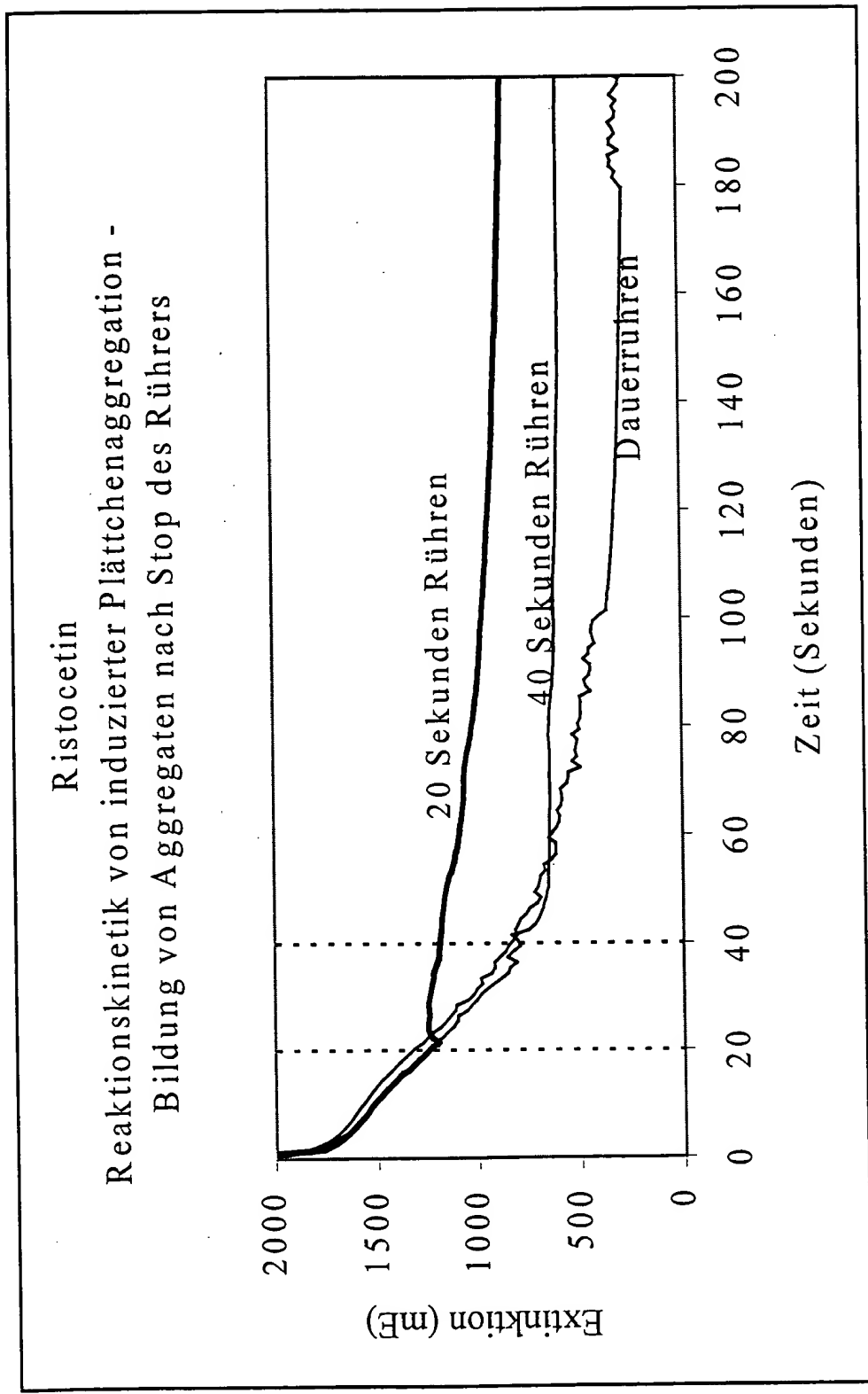


Fig. 1 b)

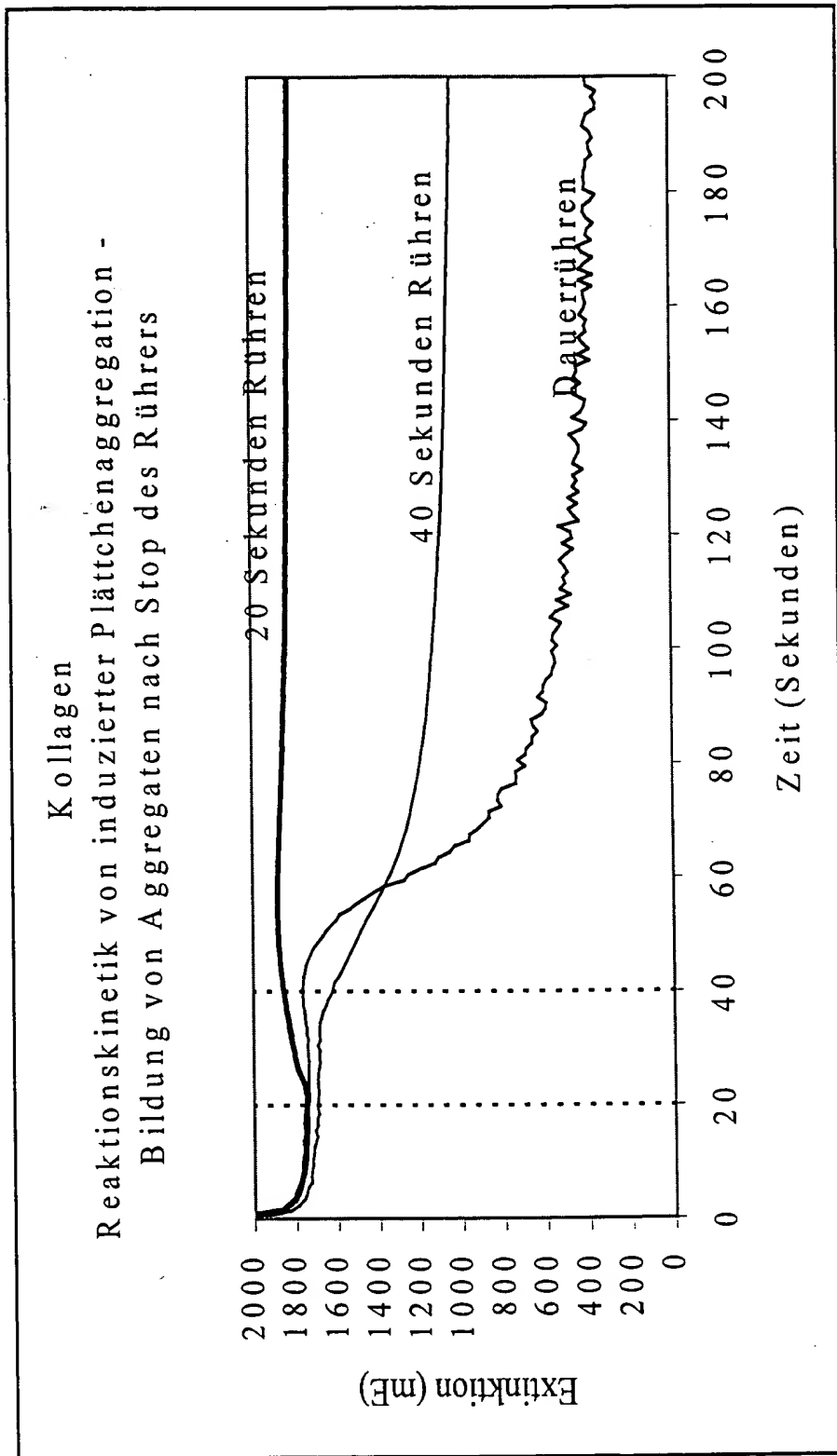


Fig. 1 c)

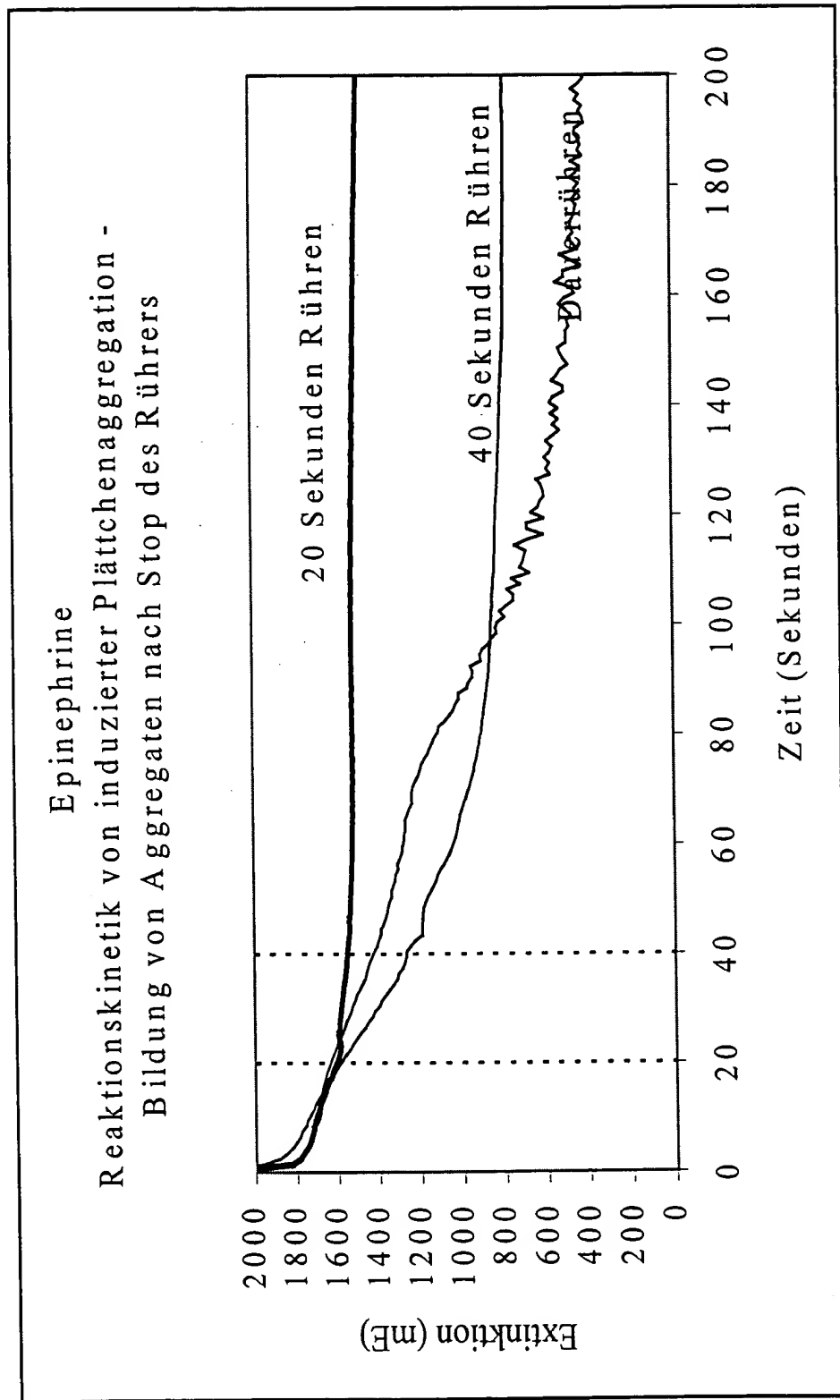


Fig. 1 d)

ADP  
Reaktionskinetik von induzierter Plättchenaggregation -  
Bildung von Aggregaten nach Stop des Rührers

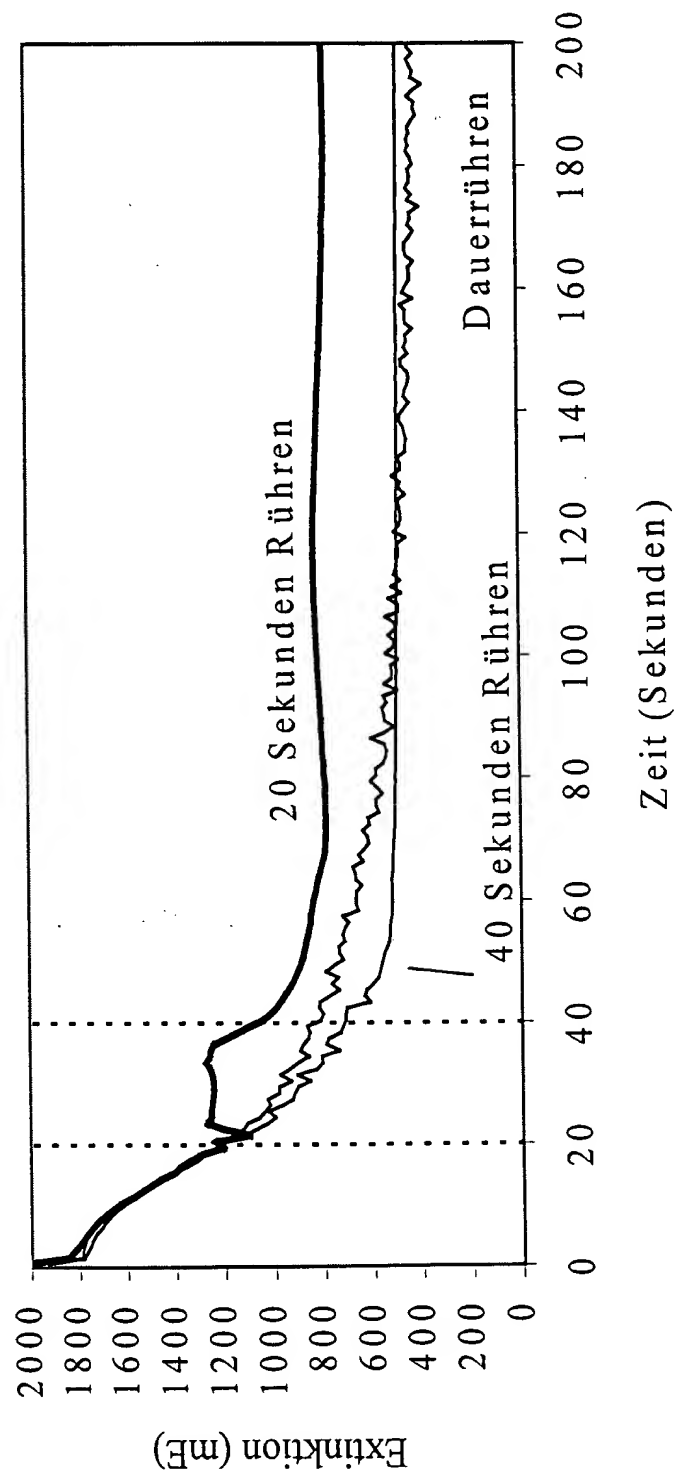


Fig. 1 e)

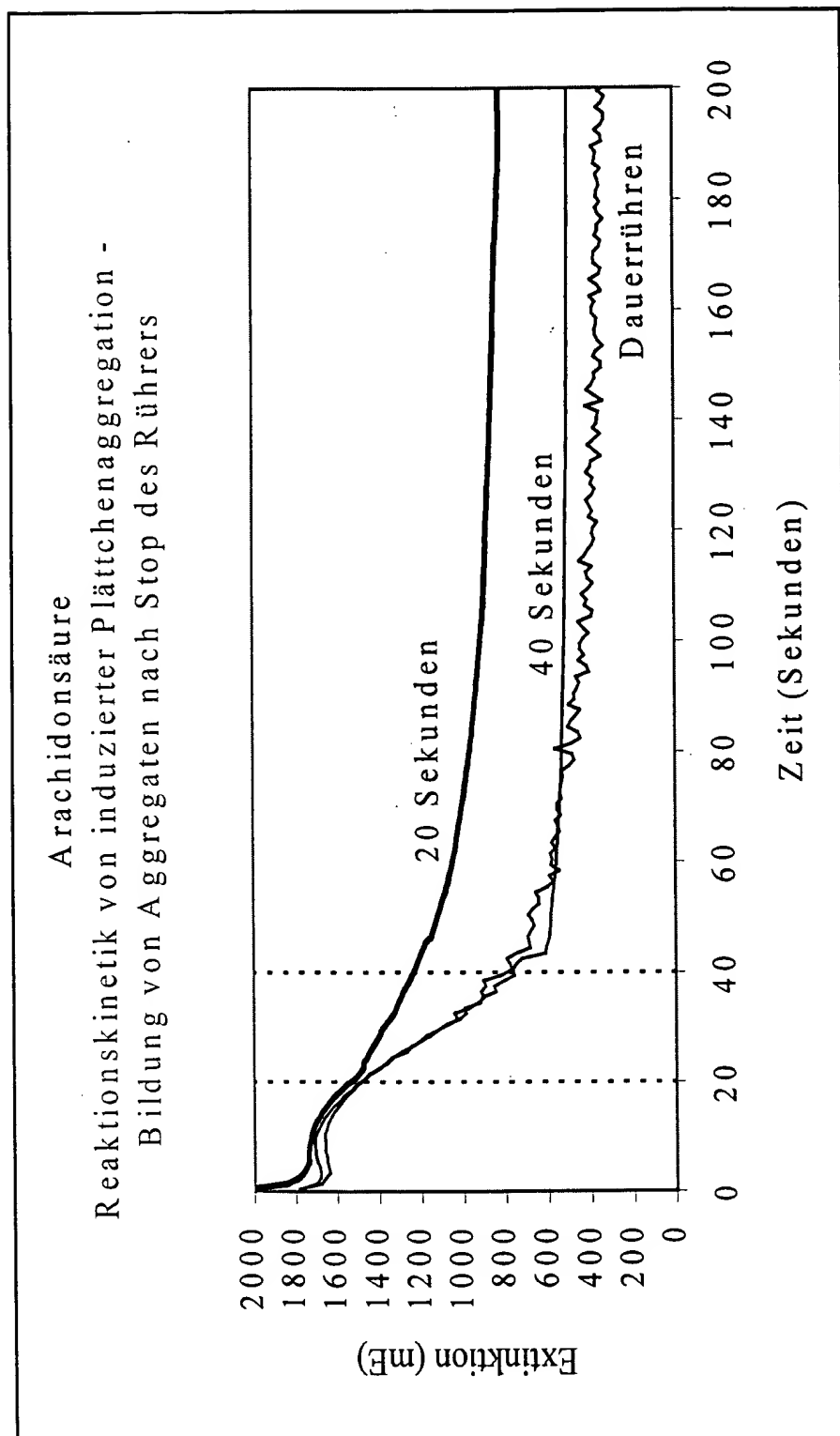




Fig. 2

# Ristocetin-Kofaktor Test Bildung der Superaggregate nach Stop des Rührers

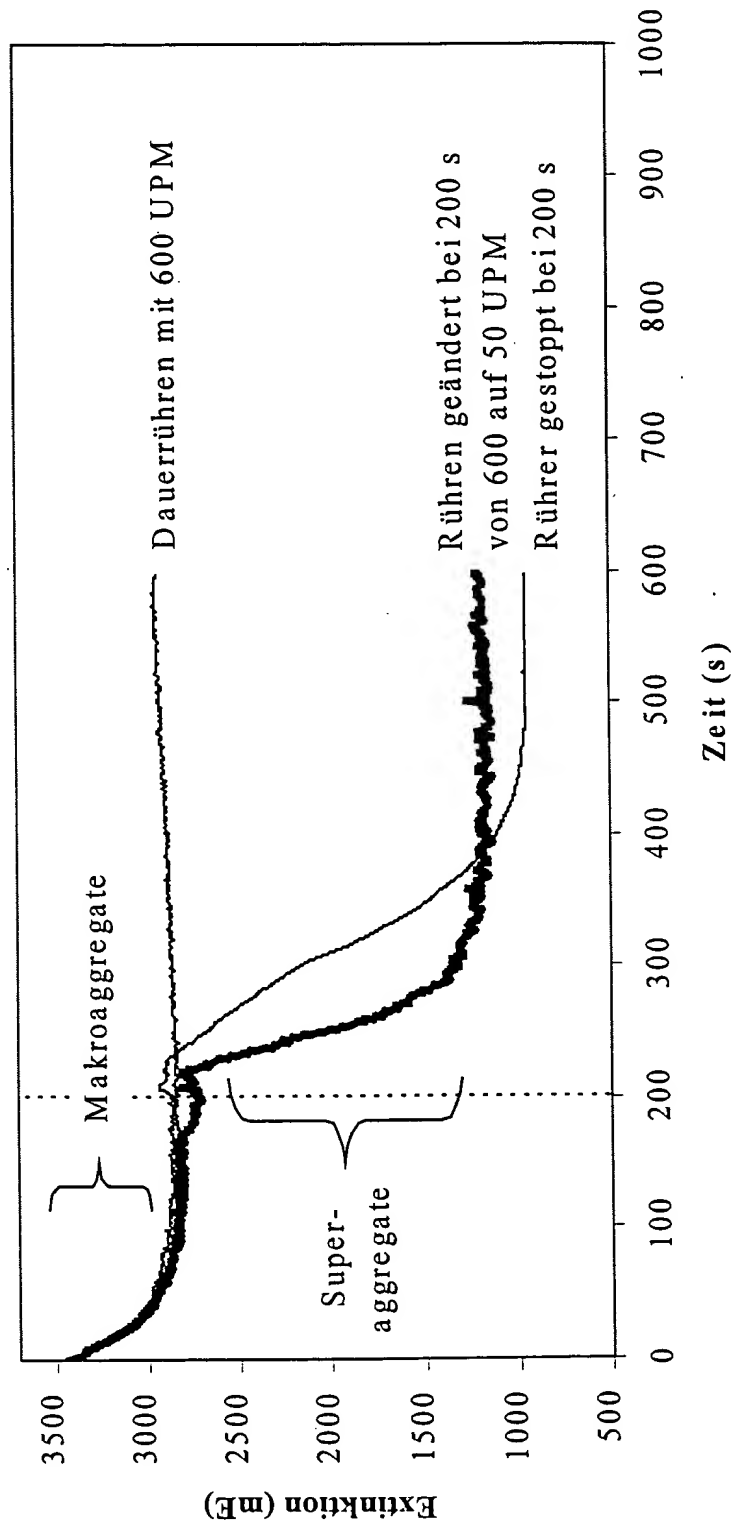


Fig. 3

# Ristocetin-Kofaktor Test Bildung der großen Makroaggregate nach Stop des Rührers

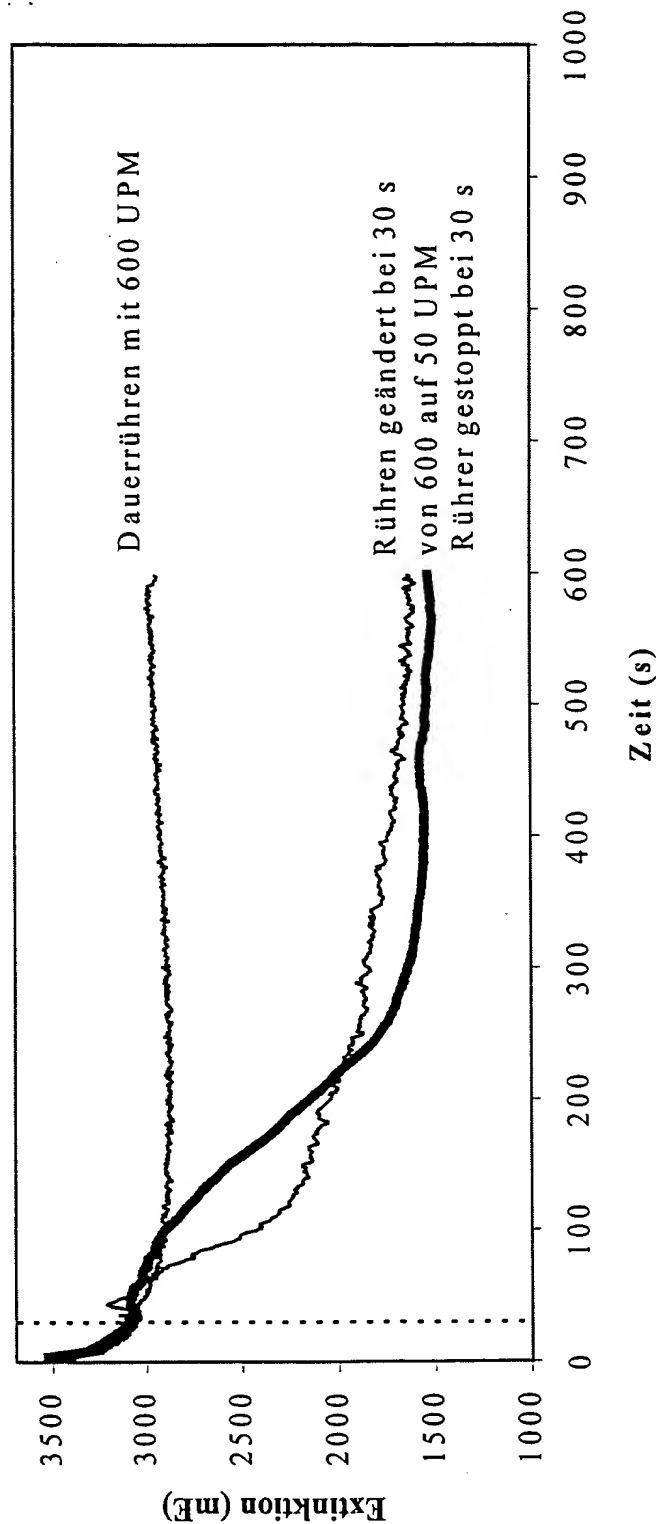


Fig. 4

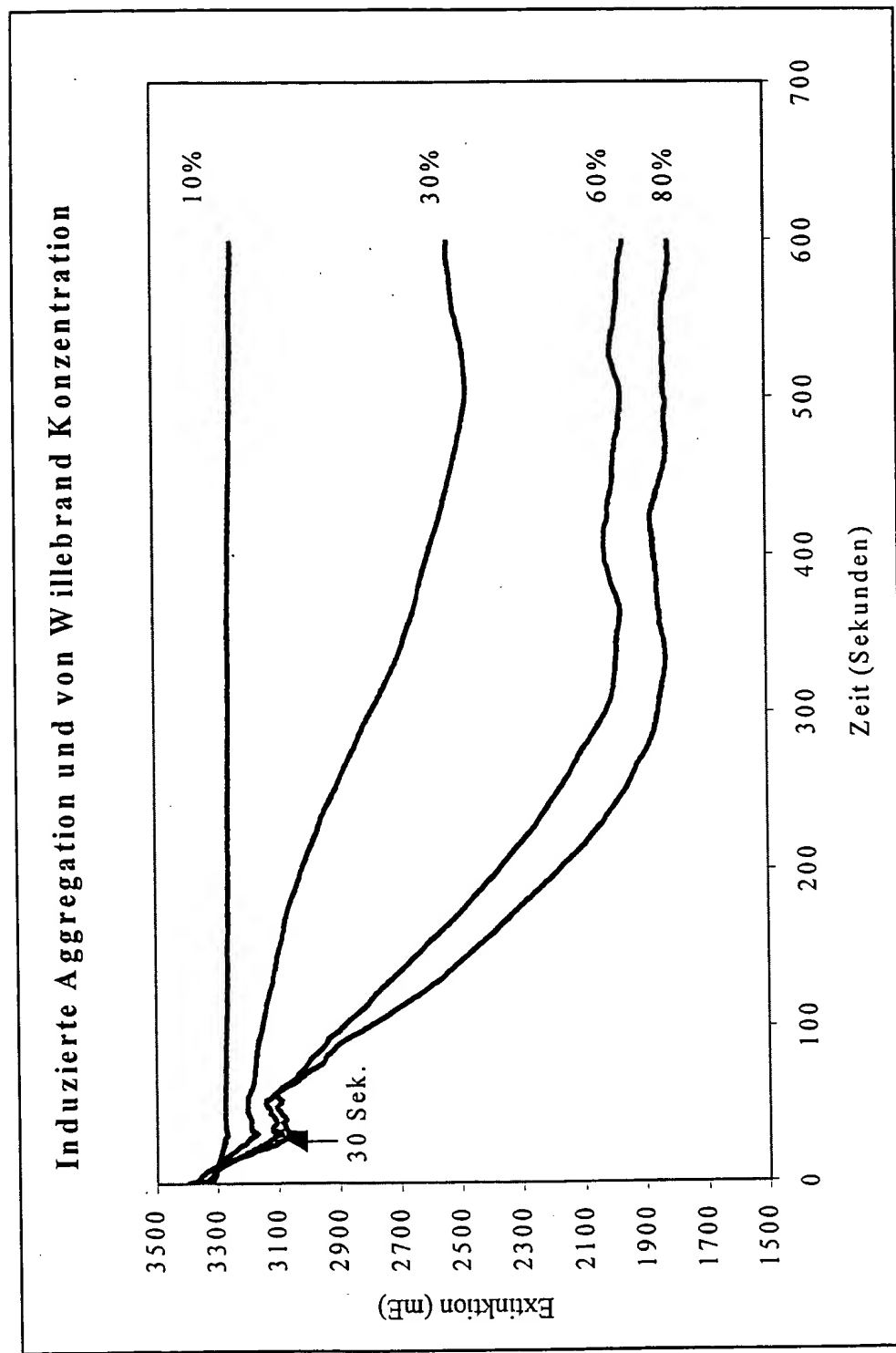


Fig. 5

Fig. 5

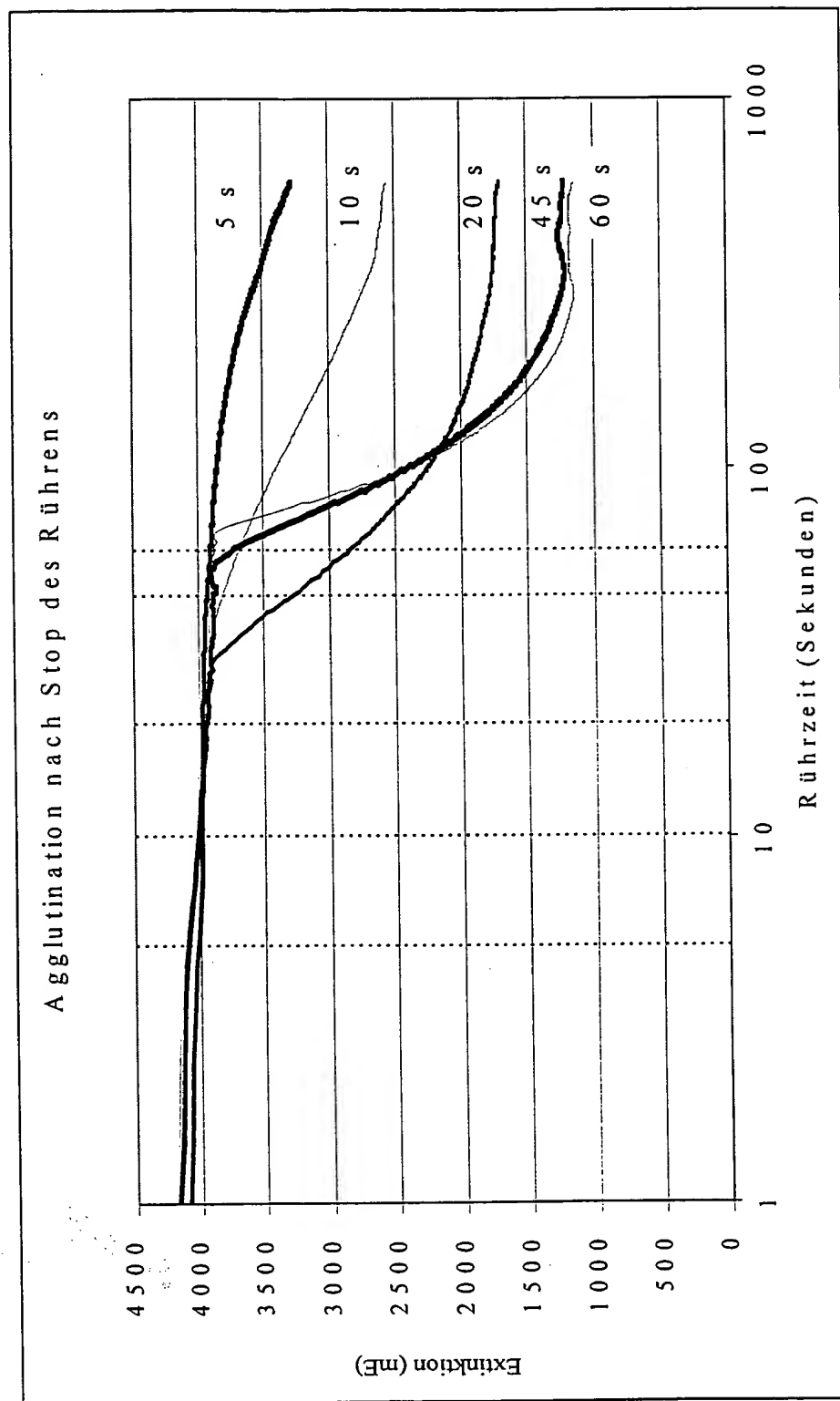


Fig. 6

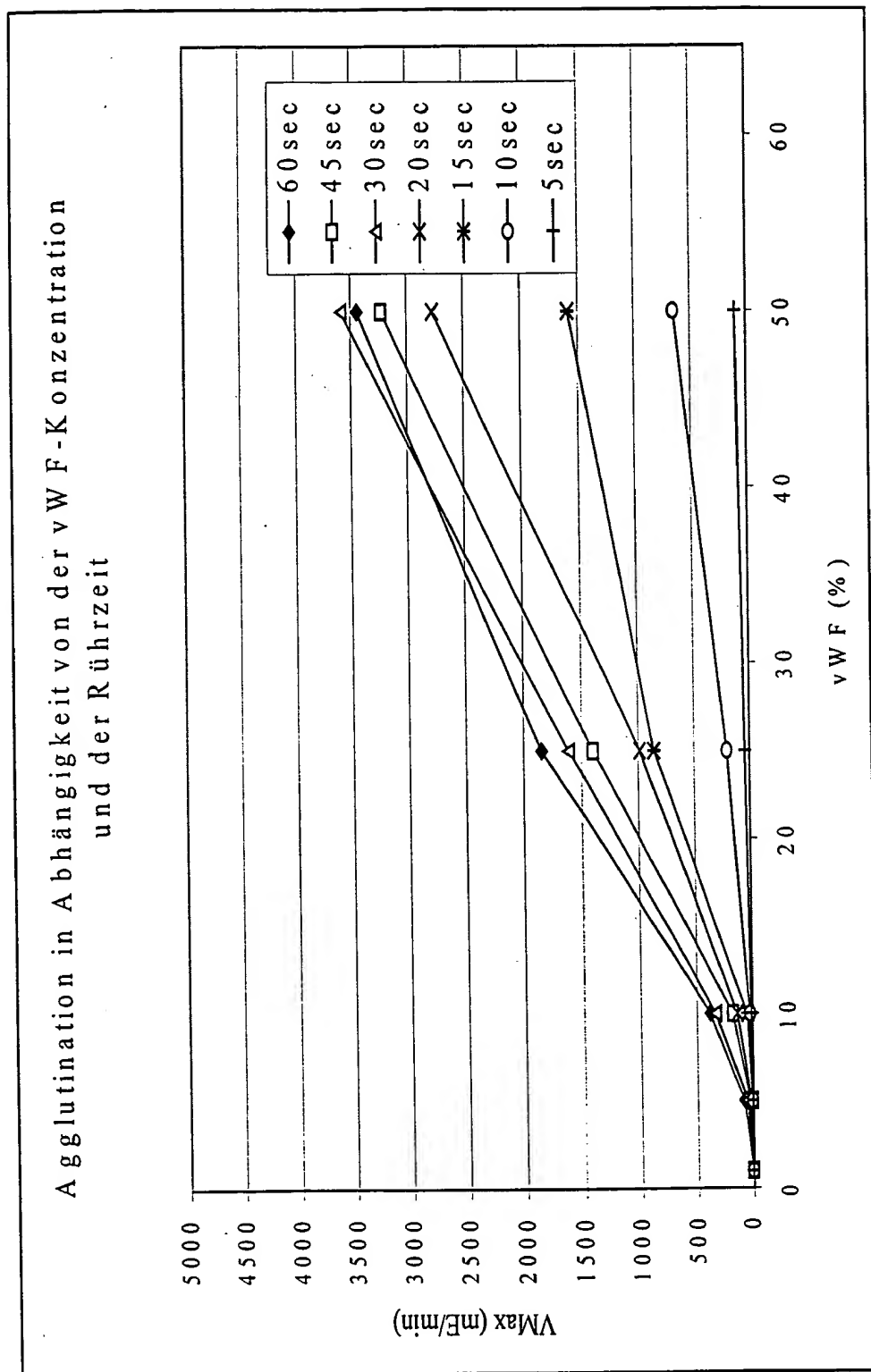


Fig. 7a)

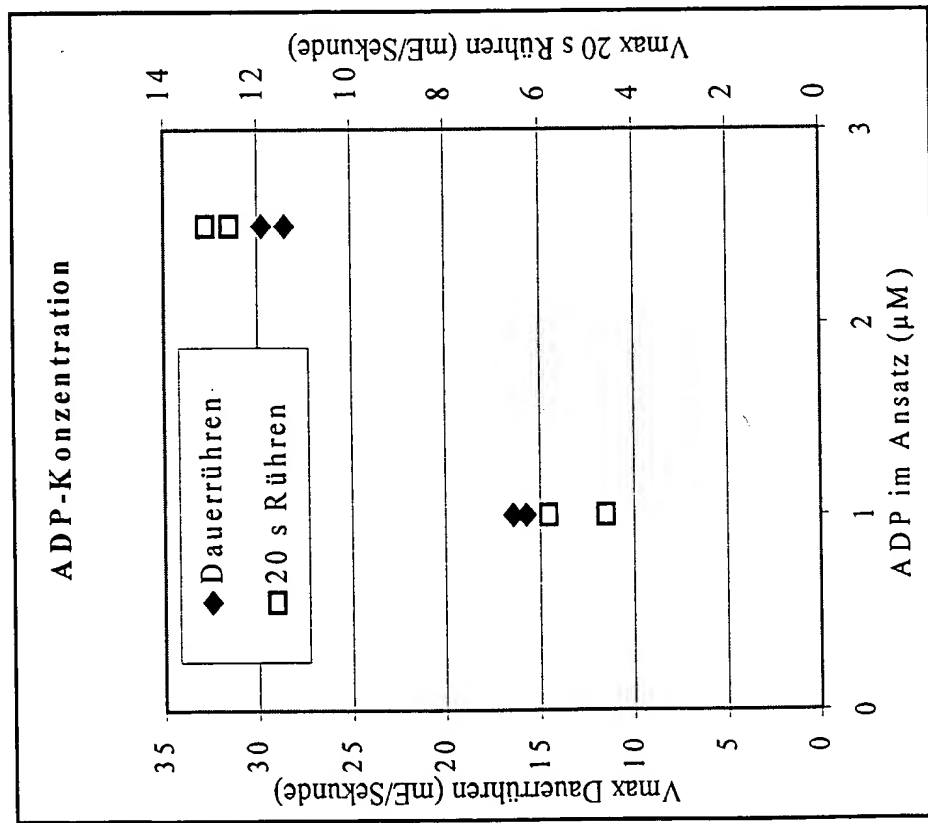


Fig. 7 b)

